

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592239

研究課題名（和文）歯髄硬組織形成能の促進・制御における smad の役割の解明

研究課題名（英文）Clarification of role of smad regulating and promoting nodule formation in the dental pulp

研究代表者

松島 潔 (MATSUSHIMA KIYOSHI)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：00157306

研究成果の概要（和文）：歯髄保存治療の適応を拡大するために、歯髄の硬組織形成能を制御・促進していると思われる smads の動態を明らかにすることを目的とした。石灰化促進する低濃度 PGE₂ 添加時には、抑制型である smad-7 が少なく、石灰化抑制する高濃度になると smad-7 の産生が上昇した。また、石灰化を促進するレーザー照射では、特異型である smad-1 が増加した。石灰化促進では、特異型の増加、抑制型の減少を示唆した。

研究成果の概要（英文）：In order to widen the indications for conservative treatment of pulp,

the purpose of this study was clarified the manner of smads which seem to facilitate the control of pulp nodule formation. During the addition of low concentration PGE₂ to promote calcification, smad-7 was inhibited. Adding high concentration PGE₂ to regulate calcification, smad-7 was enhanced. The laser irradiation to promote calcification is increased smad-1. The results suggested that to promote calcification smad-1 was enhanced and smad-7 was inhibited.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯髄硬組織形成、PGE₂、BMP、smad、レーザー照射、石灰化結節

1. 研究開始当初の背景

近年、欠損歯を補う手段としてのインプラントの技術が急速に発展し、さらに安定したインプラントを維持するためには早めの抜歯を望む傾向が現れてきている。しかし、患者のQOLを高めるためには自身の歯で噛み続けることを目標とすることに異論はないと考えている。根尖性歯周炎や歯根破折は歯を失

う原因として高い割合を占めており、これらの疾患の多くは歯髄を失うことに起因している。一方、臨床では不可逆性歯髄炎として抜歯に至り、歯髄を失うことになる。そこで歯内療法学、保存学としては抜歯などの歯髄除去療法の適応症を減らし、歯髄保存療法の適応範囲を拡大するために新たなアプローチが必要である。

歯髄 - 象牙質複合体という概念があるように、歯髄は象牙質を産生する組織であり、象牙質に囲まれていることで歯髄組織の安定した維持が図れるものである。歯髄組織は象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉細胞などの細胞で構成されており、硬組織形成能促進には未分化間葉細胞の分化促進が目的となる。一方、硬組織形成は炎症と密接な関係があり、また、処置を行う歯は少なからずも炎症は存在するため炎症との関わりを避けられない。申請者らは今までに低出力半導体レーザーを、歯髄培養細胞に照射することによる硬組織形成能の増大を報告 (J Endodon. 25:30-33, 1999)、半導体レーザー照射による歯髄硬組織形成能促進にレーザー照射によって発生したヒドロキシラジカルが大きく関与していることを報告 (Biological & Pharmaceutical Bulletin. 30:27-31, 2007) し、硬組織形成に歯髄の細胞の分化について検討、また炎症とのかかわりについては歯髄培養細胞の Prostaglandin E2 (PGE2) による硬組織形成能の分化促進と Insulin-like Growth Factor との関わりについて報告 (日本歯科保存学会誌, 46:445-450, 2003、International Journal of Oral-Medical Sciences, 2:33-28, 2004) してきた。同様に炎症性サイトカインの一つである TNF- α が ALP 活性に与える影響を観察の中で、骨形成誘導タンパク質 (BMP) などの TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担う smads のうち smad7 が炎症性サイトカインによる転写因子とされる NF- κ B によって調節され、smad7 の発現によって、硬組織形成能を有する細胞に分化した指標となる ALP 活性を抑制し、また NF- κ B の阻害である 1-Pyrrolidinecarbodithioic Acid, Ammonium Salt を添加し、TNF- α を作用させると有意に ALP 活性の上昇がみられ、促進に関与する smad と抑制に関与する smad によって調節されていることを報告 (J Endodon. 32:516-520, 2006) してきた。以上の成果を検討すると硬組織形成能促進と炎症にかかわる促進、抑制は TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達である共有型 smad4、特異型 smad1, 5, 8 と抑制型 smad6, 7 などの smads が中心となっているであろう推測を立てた。すなわち、PGE2 の濃度によって硬組織形成が促進あるいは抑制であること、特に弱い継続的な刺激があると修復象牙質 (第3象牙質) ができること、生理的な象牙質の添加 (第2象牙質)、病的な象牙質の添加 (第3象牙質) ができることなどの硬組織形成の制御に smad が多く関与していると考えた。さらに、smad による制御機構が解明できると炎症によって硬組織形成を促進させる可能性を見いだすことが期待できる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では歯髄硬組織形成にかかわる smad の役割を解明する目的で、レーザー照射あるいは炎症性サイトカイン、ケミカルメディエータなどの刺激による smad、NF- κ B やシグナル伝達系と ALP、オステオポンチン、オステオカルシン等の硬組織形成関連タンパク質の動態を明確にする。

3. 研究の方法

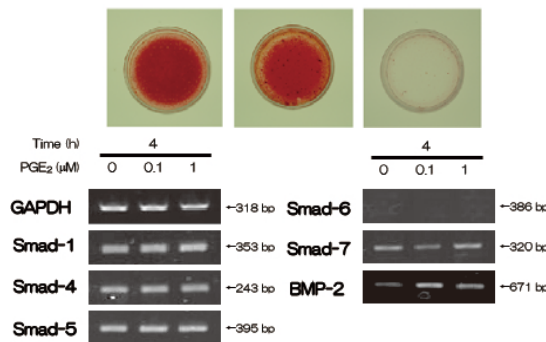
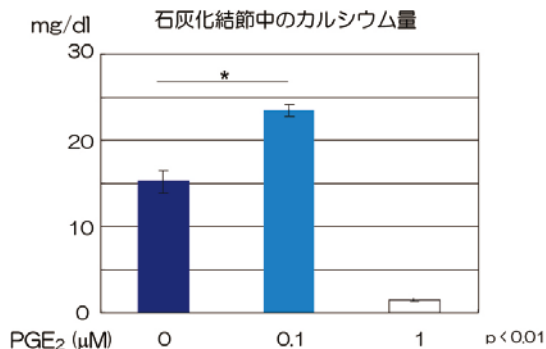
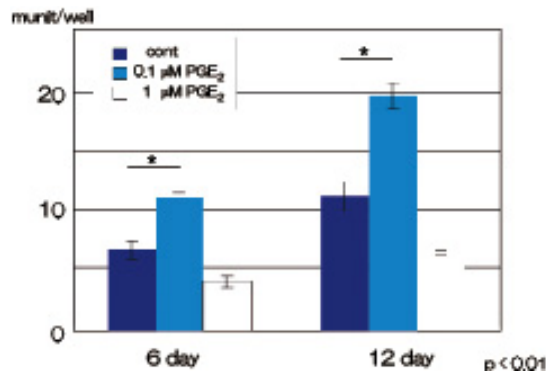
- (1) 歯髄培養細胞：歯髄細胞は矯正学的理由により抜去された歯から歯髄を無菌的に取り出し、10%ウシ胎児血清を含む α -MEM を用いて5~9代継代し、歯髄培養細胞として研究に供した
- (2) 35mmディッシュに歯髄培養細胞を播種し、培養液中が 0.1 μ M, 1.0 μ M PGE₂ になるよう添加した。
- (3) 35mmディッシュに歯髄培養細胞を播種し、波長 810 nm 出力 1W 500 秒間でレーザー照射 (Osada Lightsurge 3000) した。
- (4) 遺伝子発現の観察：RT-PCR 法で cDNA を増幅し、エチレンブロマイド染色で観察した。
- (5) タンパク質量の観察：ELISA キットを使用した。
- (6) 石灰化結節の観察：Alizarin Red S で染色し、大きさと数を観察した。
- (7) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の観察：ALP によって基質 (p-NPP) から変換された p-NP 量を測定し、活性を表した。

4. 研究成果

歯髄培養細胞において PGE2 は低濃度 (0.1 μ M) では硬組織形成促進的に作用し、高濃度 (1 μ M) では抑制的に作用していることをすでに報告している。PGE2 の濃度による特異型 smad-1, 5、共有型 smad-4、抑制型 smad-6, 7 の動態について検討した。その結果 (1) 歯髄培養細胞による石灰化物産生 (アリザリン染色) の比較では低濃度 PGE2 では濃染し、無添加 (PGE2)、高濃度 PGE2 と明らかな差を認めた。培地中の Ca 濃度も低濃度 PGE2 は無添加 (PGE2)、高濃度 PGE2 と有意に高かった。

(2) smads mRNA 発現の観察 (PGE2 作用 4 時間) では、低濃度 PGE2 で特異型 smad-1, 5、共有型 smad-4 においてコントロールと比較して変化は見られないが、抑制型 smad-7 でわずかな減少を認めた。一方、高濃度 PGE2 で特異型 smad-1, 5、共有型 smad-4 においてコントロールと比較して変化は見られないが、抑制型 smad-7 で発現量の増加を認めた。

(3) BMP-2 mRNA 発現の観察 (PGE2 作用 4 時間) では、低濃度 PGE2 でコントロールと比較して発現の増加を認め、高濃度 PGE2 でコントロールと比較して、わずかな減少が認められた。



(4) smads タンパク質発現の観察 (PGE₂ 作用 8 時間) では、低濃度 PGE₂ で特異型 smad-1, 5, 共有型 smad-4 においてコントロールと比較して変化は見られないが、抑制型 smad-7 でわずかな減少を認めた。また、リン酸化された smad-5 の増加が著しい。一方、高濃度 PGE₂ で特異型 smad-1, 5, 共有型 smad-4 においてコントロールと比較して変化は見られないが、抑制型 smad-7 で発現量の増加を認めたが、リン酸化された smad-1 および smad-5 の減少を認めた。

(5) BMP-2 タンパク質発現の観察 (PGE₂ 作用 8 時間) では、低濃度 PGE₂ でコントロールと比較して発現の増加を認め、高濃度 PGE₂ でコントロールと比較して、わずかな減少が認められた。

これらのことから、PGE₂ の濃度によって硬組織形成が促進あるいは抑制される、調節機構には、smads が多く関与していると考えられ、特に高濃度の PGE₂ の硬組織形成能抑制は smad7 の増加によるものであると示唆された。

半導体レーザー (Ga-Al-As レーザー : 波長 810 nm 1W, 500 sec) 照射による石灰化結節と BMP, smad の動態を遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで検討した。(6) レーザー照射によって、石灰化結節の増大

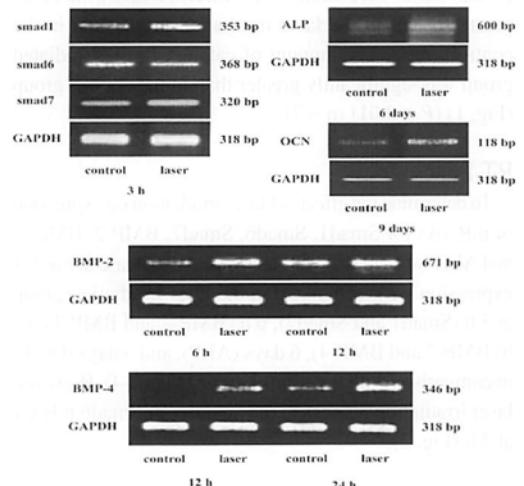
(7) アルカリフォスファターゼ活性、遺伝子レベルの増大

(8) BMP-2 の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで 6 から 12 時間後に増大

(9) BMP-4 の遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで 24 時間後に増大

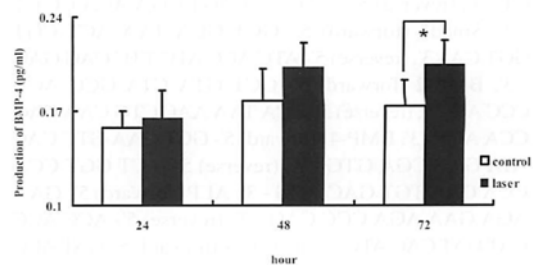
(10) 特異型 smad-1 の遺伝子発現で 3 時間後に増大

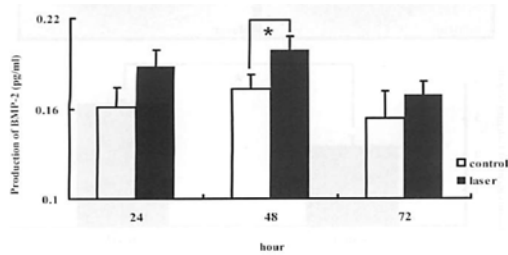
(11) タンパク質レベルでリン酸化した共有型 smad-5 の増大を認めた。半導体レーザーによって歯髄培養細胞が石灰化結節を産生することはすでに報告されていたが、レーザー照射によって、共有型 smad-5 と特異型 smad-1 が増大し、BMP のシグナルを伝達し、硬組織形成を促していることを示唆された。



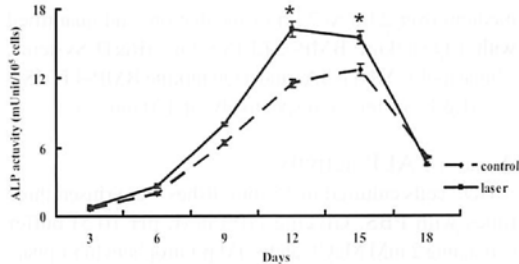
レーザー照射による smads 遺伝子発現への影響

レーザー照射による BMP-4 産生への影響

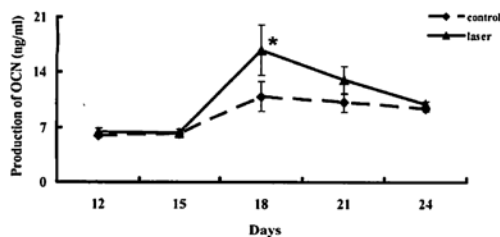




レーザ照射による BMP-2 産生への影響



レーザ照射による ALP 活性への影響



レーザ照射によるオステオカルシン産生への影響

現在、PGE2 の濃度依存による、また、レーザ照射による共有型 smad、特異型 smad、抑制型 smad および samd の動態が現れるまでの遺伝子解析の検索が進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

①半導体レーザーの照射条件がヒト歯髄培養細胞の石灰化物形成能に及ぼす影響、松井智、小峯千明、高橋知多香、和田陽子、岩井仁寿、三浦 浩、辻本恭久、池見宅司、松島潔、日本歯内療法学会誌、31、71-78、2010 (査読有)

② Stimulatory Effects of Low-Concentration Reactive Oxygen Species on Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells, S.Matsui, C.Takahashi, Y.Tsujimoto, K.Matsushima, Journal of Endodontics, 35, 67-72, 2009 (査

読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

PGE2 添加ヒト歯髄細胞の石灰化物形成における smads の動態、坂本真樹、安念素代、富田敬、武内ひとみ、松島潔、第 129 回日本歯科保存学会、2008.11.6、富山国際会議場(富山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 潔 (MATSUSHIMA KIYOSHI)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：00157306

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：